



## Isolasi dan Identifikasi Bakteri Gram Negatif pada Uterus Sapi Aceh yang Mengalami *Repeat Breeding*

(Isolation and identification of gram negative bacteria in uterine Aceh cow with repeat breeding)

Indi Rafika<sup>1</sup>, Cut Nila Thasmi<sup>1</sup>, Herrialfian<sup>1</sup>, Rosmaidar<sup>1</sup>, dan Hafizuddin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh, Indonesia

**ABSTRAK.** Penelitian ini bertujuan mengetahui jenis bakteri Gram negatif pada uterus sapi Aceh yang mengalami kawin berulang. Dalam penelitian ini digunakan enam ekor sapi Aceh betina yang terdiri atas tiga ekor sapi fertil (K1) dan tiga ekor yang mengalami kawin berulang (K2, *repeat breeding*, RB). Pengambilan sampel bakteri dalam uterus sapi dilakukan dengan menggunakan *swab* steril yang disimpan dalam media *nutrient broth* (NB) untuk isolasi dan identifikasi jenis bakterinya. Berdasarkan hasil penelitian, baik K1 dan K2, positif terinfeksi bakteri dan diperoleh 16 isolat bakteri di antaranya enam isolat berasal dari K1 dan sepuluh isolat berasal dari K2. Dari 10 isolat bakteri Gram negatif yang ditemukan pada sapi RB terdiri atas *Escherichia coli* (*E. coli*) (30,00%), *Pseudomonas* sp. (30,00%), *Enterobacter* sp. (20,00%), *Klebsiella* sp. (20,00%). Disimpulkan bahwa bakteri yang paling banyak menginfeksi uterus sapi RB adalah *E. coli* dan *Pseudomonas* sp.

**Kata kunci:** *Repeat breeding*, sapi Aceh, gram negatif

**ABSTRACT.** The study determined the type of Gram negative bacteria of the Aceh cattle uterus which has been diagnosed with repeat breeding. The study was conducted on six Aceh cows consists of 3 normal fertile cows (K1) and 3 repeat breeding cows (K2, RB). The bacteria in uterine samples were collected using sterile swab, kept into nutrient broth (NB) for further isolation and identification of bacteria. The result of the study showed that the total of 16 isolates of bacteria was observed in all cows : 6 isolates from group K1 and 10 isolates from group K2. A total of 10 isolates from cattle with repeat breeding consist of *Escherichia coli* (*E. coli*) (30.00%), *Pseudomonas* sp (30.00%), *Enterobacter* sp (20.0%), and *Klebsiella* sp (20.0%). It can be concluded that the most bacteria that infect uterine cows with repeat breeding are *E. coli* and *Pseudomonas* sp.

**Keywords:** Repeat breeding, Aceh cattle, gram negative

### PENDAHULUAN

Permasalahan rendahnya efisiensi reproduksi sering terjadi pada sapi potong di Indonesia yang mengindikasikan terjadinya gangguan reproduksi. Salah satu gangguan reproduksi yang paling umum pada sapi adalah kawin berulang (*repeat breeding*, RB). Kawin berulang adalah sapi betina yang mempunyai siklus normal dan telah dikawinkan minimal tiga kali dengan pejantan atau semen pejantan fertil tetapi belum bunting tanpa disertai gejala klinis dari penyakit atau abnormalitas alat reproduksi (Juliana *et al.*, 2015). Kawin berulang merupakan suatu masalah multifaktorial dan penyebab utama kemajiran pada sapi dan kerbau. Kejadian RB telah dilaporkan dari 6,0-30,6% pada kerbau (Gupta *et al.*, 2005) dan sekitar 53,8% pada sapi Aceh (Subagyo, 2016).

Salah satu penyebab RB adalah infeksi bakteri. Infeksi bakteri pada ternak yang dapat menyerang alat reproduksi, khususnya pada

uterus, dibagi menjadi dua kelompok yaitu infeksi oleh bakteri non-spesifik dan infeksi oleh bakteri spesifik. Infeksi organ reproduksi sapi baik yang spesifik maupun yang non-spesifik menyebabkan banyaknya kegagalan kebuntingan pada sapi (Sirohi *et al.*, 1989). Infeksi non-spesifik dari organ reproduksi dianggap menjadi penyebab utama berulangnya kegagalan fertilisasi akibat peningkatan jumlah mikroorganisme dan/atau virulensinya (Singia *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 1996). Peningkatan sejumlah bakteri non-spesifik pada uterus dapat menyebabkan timbulnya kegagalan konsepsi (Joshi *et al.*, 2013).

Faktor predisposisi penyebab RB akibat infeksi bakteri adalah distokia, retensi plasenta, prolapsus uterus, dan gangguan ovarium. Infeksi pada uterus dapat terjadi baik setelah perkawinan atau setelah partus dapat menyebabkan endometritis (Robert, 1986). Lingkungan yang buruk terutama pada pascapartus akan memudahkan masuknya mikroba ke dalam lumen uterus, mencemari lingkungan lumen uterus, mengganggu kehidupan embrio yang dapat menyebabkan kematian embrio dini (Arthur *et al.*, 2001).

Sanitasi lingkungan, khususnya kandang, sangat menentukan tingkat pencemaran uterus

\*Email Korespondensi: hafizuddin\_umar@unsyiah.ac.id

Diterima: 17 Juni 2020

Direvisi: 10 Juli 2020

Disetujui: 23 September 2020

DOI: <https://doi.org/10.17969/agripet.v20i2.17017>

pascapartus karena lantai kandang merupakan tempat berkembangbiaknya bakteri non-spesifik penyebab infeksi uterus. Bakteri-bakteri non-spesifik tersebut antara lain *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Escherichia coli* dan *Corynebacterium pyogenes*. *Corynebacterium pyogenes* merupakan bakteri yang paling sering menyebabkan infeksi uterus secara menetap. Bakteri non-spesifik yang lain yang dapat berada di dalam uterus dalam jumlah yang cukup besar adalah *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *E. coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* yang dapat menimbulkan peradangan uterus atau induk sapi menderita RB (Hardjopranjoto, 1995). Sampai saat ini belum terdapat laporan mengenai penyebab RB pada sapi Aceh, khususnya faktor penyebab yang berasal dari bakteri. Berdasarkan hal tersebut, perlu dilakukan suatu penelitian yang bertujuan mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri yang berhubungan dengan kasus RB pada sapi Aceh.

## MATERIAL DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Unit Pelaksana Teknis Hewan Coba Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala dan Laboratorium Kesehatan, Banda Aceh. Hewan yang digunakan terdiri atas tiga ekor sapi fertil (K1) dan tiga ekor sapi yang mengalami RB (K2). Sapi K1 merupakan sapi >2 bulan pascapartus yang mempunyai riwayat berhasil bunting dengan sekali inseminasi dan mempunyai dua kali siklus reguler, sedangkan K2 terdiri atas sapi yang didiagnosis mengalami RB yaitu sapi yang gagal bunting setelah lebih dari tiga kali inseminasi namun memiliki siklus estrus normal.

Spesimen untuk pemeriksaan bakteri berupa hasil *swab* diambil secara intra-uterin dengan cara memasukkan *gun* yang diletakkan kapas di ujungnya. Spesimen yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi *nutrient broth* dan dibawa ke laboratorium untuk diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Kemudian dilakukan isolasi dan pengecatan Gram. Koloni yang tumbuh diamati, bentuk, dan sifat Gramnya (Yilmaz *et al.*, 2012; Hasan *et al.*, 2015).

## Prosedur Penelitian

### Isolasi Bakteri

Mikroba lumen uterus dianalisis dengan menumbuhkan sampel uterus pada media kultur primer menggunakan plat agar darah dan McConkey Agar (MCA). Kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Setelah itu,

dilakukan pewarnaan Gram untuk melihat morfologi bakteri secara mikroskopis dan uji biokimia untuk mengidentifikasi bakteri (Yilmaz *et al.*, 2012).

### Pewarnaan Gram

Preparat apus bakteri dibuat dengan cara mencampurkan satu biakan bakteri dengan NaCl fisiologis yang telah ditetaskan pada objek gelas, kemudian dibuat preparat apus, dikeringkan, dan difiksasi di atas lampu spiritus. Preparat apus ditetesi pewarna pertama dengan karbol gentian (kristal) violet selama 2 menit, dicuci dengan air mengalir, ditetesi lugol selama 1 menit, kemudian preparat apus dilunturkan dengan alkohol 90% selama 10 detik. Selanjutnya alkohol dibuang, preparat dicuci dengan akuades dan diberi *safranin* selama 1 menit. Warna kemudian dibuang dan dibersihkan dengan akuades, dikeringkan dan diamati morfologi sel, serta warnanya diamati di bawah mikroskop. Bakteri dikelompokkan sebagai Gram positif apabila selnya terwarnai keunguan, dan Gram negatif apabila selnya terwarnai merah (Hasan *et al.*, 2015).

### Identifikasi Bakteri

Uji biokimia dilakukan untuk mengidentifikasi dan mendeterminasi bakteri berdasarkan sifat-sifat biokimiawinya. Beberapa uji biokimia yg dilakukan yaitu uji oksidase, uji katalase, uji gula-gula, uji *urease*, uji penggunaan sitrat, uji *motility*, uji *methy red-Voges Proskauer* (MR-VP), uji *triple sugar iron agar* (TSI), dan uji lisin. Pada uji oksidase, menggunakan reagen/larutan *tetramethyl-paraphenyldiamine*.

Media-media yang digunakan untuk uji gula-gula yaitu media glukosa, laktosa, maltosa, dan sukrosa yang ditambahkan dengan indikator *phenol red*. Pada uji *urease* menggunakan media urea *broth* dan urea agar. Pada uji penggunaan sitrat menggunakan media *Simmons citrat*. Uji MR-VP pada media MR menggunakan indikator larutan *alpha-naphtol* 5% dan pada media VP menggunakan indikator KOH 40%. Media SIM digunakan untuk uji *motility*, media TSIA digunakan untuk mengetahui bakteri yang dapat menfermentasi gula dan uji lisin menggunakan media (Yilmaz *et al.*, 2012).

### Analisis Data

Data hasil isolasi dan identifikasi bakteri Gram negatif pada lumen uterus sapi Aceh dianalisis secara deskriptif.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi dan identifikasi bakteri Gram negatif pada uterus sapi Aceh diperoleh beberapa jenis bakteri dan frekuensi yang berbeda seperti yang disajikan pada Tabel 1. Pada penelitian yang dilakukan oleh Bhat *et al.* (2014), jenis dan persentase bakteri yang diisolasi dari sapi RB adalah *Staphylococcus spp.* (21,05%), *E. coli* (18,42%), *Bacillus spp.* (13,16%), *Corynebacterium spp.* (13,16%), *Pseudomonas spp.* (10,53%), *Proteus spp.* (10,53%), *Klebsiella spp.* (7,89%), dan *Streptococcus spp.* (5,26%).

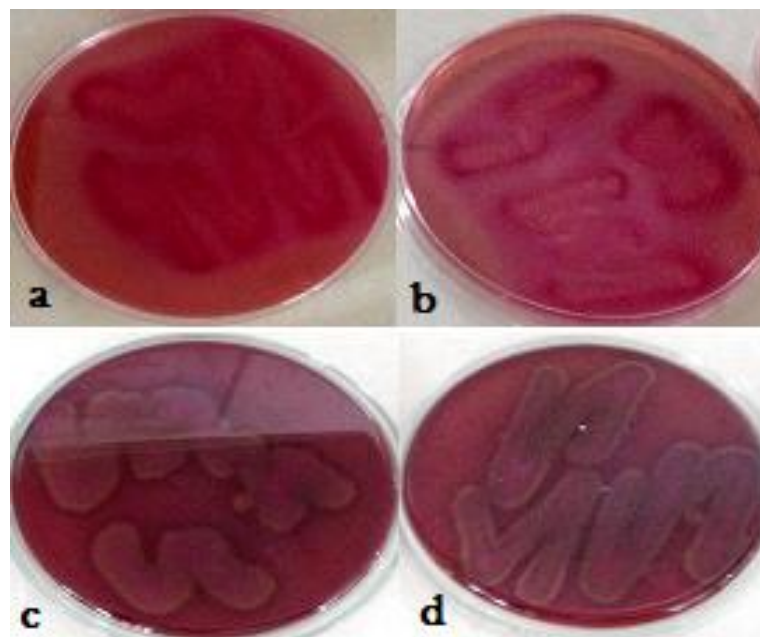
Hasil penamaan jenis bakteri diperoleh dengan memperhatikan sifat-sifat koloni, pewarnaan Gram dan hasil uji biokimia (Gambar 1-3) maka dapat diisolasi dan diidentifikasi berbagai jenis bakteri Gram negatif yang terdapat pada uterus sapi Aceh yaitu *E. coli*, *Pseudomonas sp.*, *Klebsiella sp.* dan *Enterobacter sp.* Menurut Benyamin *et al.* (1982) dan Naik (1982), *E. coli* merupakan salah satu bakteri yang pada umumnya menyebabkan gangguan reproduksi seperti RB, endometritis, vaginitis, dan vulvitis.

Tabel 1. Frekuensi distribusi isolat bakteri pada uterus sapi Aceh fertil dan sapi Aceh *repeat breeding*

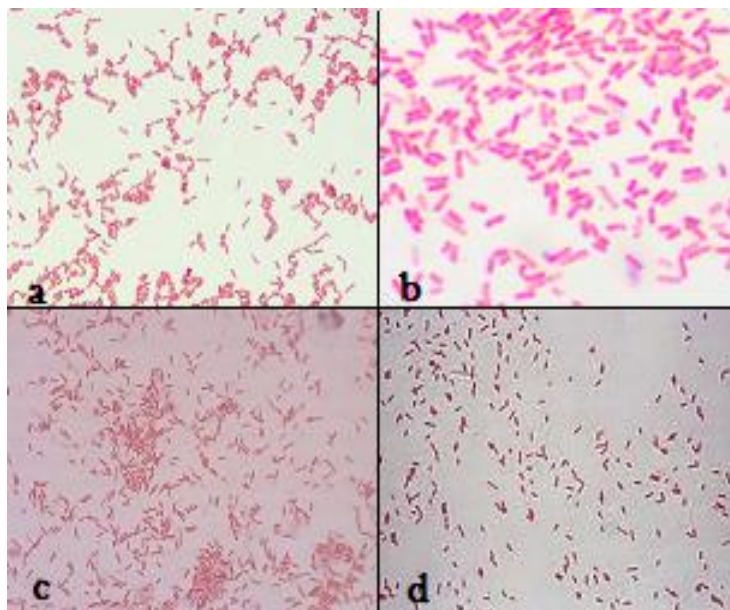
Isolat bakteri	Sapi Fertil (K1)		Repeat Breeding (K2)	
	Frekuensi	(%)	Frekuensi	(%)
<i>E. coli</i>	2	33,33	3	30,00
<i>Pseudomonas sp</i>	1	16,67	3	30,00
<i>Enterobacter sp</i>	1	16,67	2	20,00
<i>Klebsiella sp</i>	2	33,33	2	20,00

Pada media *Mc Conkey*, koloni *E. coli* terlihat berukuran sedang, berwarna merah bata, rata, sedikit cembung. Pada pewarnaan Gram *E. coli* berwarna merah muda, berbentuk batang dan kokus, terpisah-pisah dan ada juga yang bergabung membentuk rantai pendek dan tidak membentuk spora. Menurut Gani *et al.* (2008), *E. coli* adalah bakteri Gram negatif, yang berbentuk

batang dan terpisah-pisah dalam pewarnaan Gram. Singh *et al.* (1989) menyatakan bahwa ditemukan *E. coli*, diduga karena adanya kontaminasi tinja yang mengandung bakteri tersebut, dikarenakan letak anus berdekatan dengan saluran reproduksi. Bakteri ini merupakan flora normal saluran pencernaan hewan dan manusia.



Gambar 1. Bentuk koloni *E. coli* (a) dan *Pseudomonas sp* (b) pada media MCA, dan bentuk koloni *Enterobacter sp* (c) dan *Klebsiella sp* (d) pada media BA



Gambar 2. Bentuk bakteri *E. coli* (a), *Pseudomonas sp* (b), *Enterobacter sp* (c) dan *Klebsiella sp* (d) pada pewarnaan Gram

Pada media *Mc Conkey*, koloni *E. coli* terlihat berukuran sedang, berwarna merah bata, rata, sedikit cembung. Pada pewarnaan Gram *E. coli* berwarna merah muda, berbentuk batang dan kokus, terpisah-pisah dan ada juga yang bergabung membentuk rantai pendek dan tidak membentuk spora. Menurut Gani *et al.* (2008), *E. coli* adalah bakteri Gram negatif, yang berbentuk batang dan terpisah-pisah dalam pewarnaan Gram. Singh *et al.* (1989) menyatakan bahwa ditemukan *E. coli*, diduga karena adanya kontaminasi tinja yang mengandung bakteri tersebut, dikarenakan letak anus berdekatan dengan saluran reproduksi. Bakteri ini merupakan flora normal saluran pencernaan hewan dan manusia.

*Pseudomonas sp.* adalah bakteri Gram negatif berbentuk batang, motil, bersifat *aerob*, katalase, dan oksidase positif, dan menfermentasi glukosa. Menurut Gani *et al.* (2008), *Pseudomonas sp* menghasilkan koloni kasar pada NA dan hemolisis  $\beta$  di BA. Pada pewarnaan Gram terungkap sebagai Gram negatif dan berbentuk batang.

*Enterobacter spp.* tumbuh pada media BA dengan ukuran koloni sedang-besar, sedikit cembung, bulat, berwarna putih sampai abu-abu dan *anahaemolitik*. pada pewarnaan Gram adalah berwarna merah muda dan berbentuk batang. Bakteri ini memfermentasi gula-gula, motil, indol positif, katalase dan oksidase positif. Bisping dan Amtsberg (1988), menyatakan bahwa pada sapi yang terinfeksi *Enterobacter aerogenes* dapat menyebabkan abortus dan mastitis. *Klebsiella sp*

adalah bakteri Gram negatif, berbentuk batang pendek, menfermentasi gula-gula dan motil. Bakteri ini dapat menyebabkan abortus. Menurut Gillespie dan Timoney (1981), abortus terjadi karena berhubungan dengan bentuk enterik dan septikemik penyakit.

Infeksi bakteri pada sapi fertil juga dilaporkan oleh Das *et al.* (1996). Infeksi uterus pascapartus dihasilkan dari kontaminasi uterus dengan bakteri selama proses kelahiran (Azawi *et al.*, 2008), sehingga beberapa hewan normal juga dapat terkontaminasi dengan bakteri ini (Shukla dan Sharma, 2005; Sharma *et al.*, 2008). Beberapa peneliti sebelumnya memperoleh mukus serviks steril dari beberapa sapi yang normal (Mane *et al.*, 2009). Pada sapi RB, infeksi bakteri pada penelitian ini lebih tinggi dari laporan Singh *et al.* (1989). Singh *et al.* (1998) melaporkan tingkat infeksi sebesar 62,2% pada sapi RB. Jumlah sapi RB positif pada penelitian ini hampir sama dengan laporan Dholakia *et al.* (1987).

Isolat bakteri ditemukan pada setiap sampel dari sapi RB maupun sapi normal. Kelompok sampel yang memiliki dua jenis isolat bakteri yaitu 100% pada sapi normal dan kelompok sampel yang memiliki tiga jenis isolat bakteri yaitu 100% pada sapi RB (Tabel 2). Dari uji *White Side Test* (WST) yang dilakukan oleh Bhat *et al.* (2014), diketahui bahwa hanya 15,00% sapi normal yang terinfeksi bakteri, sedangkan pada sapi RB persentase sapi yang mengalami infeksi bakteri sebanyak 71,25%.

Tabel 2. Hasil pertumbuhan bakteri pada sapi Aceh fertil dan sapi Aceh *repeat breeding*

Parameter	Sapi Fertil (K1)		Repeat breeding (K2)	
	N	(%)	n	(%)
Jumlah sampel positif ada isolat bakteri	3	100	3	100
Jumlah sampel bebas isolat bakteri	0	0	0	0
Jumlah sampel dengan isolat bakteri tunggal	0	0	0	0
Jumlah sampel dengan dua isolat bakteri	3	100	0	0
Jumlah sampel dengan tiga isolat bakteri	0	0	3	100

Secara normal bakteri non-spesifik tidak menyebabkan gangguan saluran reproduksi sapi betina. Tetapi bila ada luka-luka, maka bakteri ini akan menjadi patogen dan menyebabkan peradangan, yaitu vaginitis, servisititis, maupun endometritis. Akibat infeksi bakteri-bakteri ini, sapi sudah beberapa kali dikawinkan tidak bunting juga. Setelah terjadi infeksi bakteri, tubuh hewan akan berusaha untuk mengeluarkan bakteri. Reaksi tersebut di antaranya adalah dihasilkannya eksudat yang umumnya memiliki pH rendah, temperatur di vagina meningkat. Pada kondisi infeksi lebih buruk, terjadi indurasi jaringan, sehingga kondisi saluran reproduksi tidak sesuai bagi ovum, spermatozoa, fertilisasi, dan implantasi.

Umumnya, infeksi uterus non-spesifik dianggap menjadi penyebab utama RB yaitu bertambahnya jumlah mikroorganisme akan menyebabkan servisititis atau endometritis dari bermacam tingkat yang dapat menyebabkan kematian embrio dan masalah RB (Joshi *et al.*, 2013). Prevalensi infeksi uterus lebih tinggi pada sapi persilangan daripada sapi lokal. Sapi yang diinseminasi buatan menderita infeksi uterus lebih tinggi daripada sapi yang dikawinkan secara alami. Namun, persentase bakteri yang ditemukan dalam sampel yang sakit lebih tinggi daripada sampel yang terinfeksi. Hal ini juga diamati bahwa sapi tua paling rentan terhadap gangguan reproduksi dan infeksi uterus dibandingkan sapi muda (Azizunnesa, 2011).

### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, baik kelompok sapi fertil dan kelompok sapi *repeat breeding*, diperoleh 16 isolat bakteri di antaranya enam isolat berasal dari sapi fertil dan sepuluh isolat berasal dari sapi RB. Isolat bakteri Gram negatif yang ditemukan pada sapi RB terdiri atas *E. coli* (30,00%), *Pseudomonas sp* (30,00%), *Enterobacter sp* (20,00%), *Klebsiella sp* (20,00%).

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi melalui Universitas Syiah Kuala dengan skim Hibah Tim Pascasarjana Tahun 2017.

### DAFTAR PUSTAKA

- Arthur, G.H., Noakes, R.J., Pierson, H.W., 2001. Veterinary Reproduction and Obstetrics. W.B. Saunders Co., Philadelphia.
- Azawi, O.I., Omran, S.N., Hadad, J.J., 2008. A study of endometritis causing repeat breeding of cycling Iraqi Buffalo cow. *Reprod. Dom. Anim.* 43(6): 735-743.
- Azizunnesa, S., Joy, D., Faruk, M.O., 2011. Isolation and identification of uterine microorganisms in postpartum dairy cows. *Bangladesh J. Microbiol.* 28(1): 19-23.
- Benyamin, B.R., Yadaf, V.K., Ansari, M.R., Naidu, M.K., 1982. Bacteriological studies on cases of repeat breeders and metritis in bovines. *Indian J. Comp. Infec. Dis.* 3: 201-203.
- Bhat, F.A., Bhattacharyya, H.K., Hussain, S.A., 2014. White side test: A simple and rapid test for evaluation of nonspecific bacterial genital infections of repeat breeding cattle. *Vet. Res. Forum.* 5(3): 177-180.
- Bisping, W., Amtsberg, G., 1988. Colour Atlas for the Diagnosis of Bacterial Pathogens in Animals. Paul Parery Scientific Publishers. Berlin and Hamburg. pp. 72-78.
- Das, K.L., Misra, P.R., Kar, B.C., 1996. Aerobic bacterial isolates and their Antibigram in repeat breeder cows. *Indian Vet. J.* 73: 900-902.
- Dholakia, P.M., Shah, N.M., Purohit, J.H., 1987. Bacteriological study on non-specific genital infections and its antibiotic spectra in repeat breeders. *Indian Vet. J.* 64: 637-640.



- Gani, M.O., Amin, M.G., Alam, M.G., Kayesh, M.E., Karim, M.R., Samad, M.A., Islam, M.R., 2008. Bacterial flora associated with repeat breeding and uterine infections in dairy cows. *Bangladesh J. Vet. Med.* 6(1): 79-86.
- Gillespie, J.H., Timoney, J.F., 1981. *Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals*. 8<sup>th</sup> ed. Cornell University Press, Ithaca and London, United Kingdom.
- Gupta, A.G., Deopurkar, R.L., 2005. Microbial study of gynaecological infection in cattle. *Indian J. Anim. Reprod.* 14: 118-119.
- Hardjopranojoto, H.S., 1995. *Ilmu Kemajiran pada Ternak*. Airlangga University Press, Surabaya.
- Joshi, S., Mudasir, M., Sharma, D., Saraswat, N. and Singh, R., 2013. Bacterial Microflora Associated with Repeat Breeding in Crossbred Dairy Cattle. *Indian Vet. J.* 90(6):52-54.
- Juliana, A., Hartono, M., Suharyati, S., 2015. Repeat breeder pada sapi Bali di Kabupaten Pringsewu. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*. 3(2): 42-47.
- Mane, P.M., Dhoble, R.L., Chaudhari, R.J., 2009. Bacterial spectrum, antibiotic sensitivity pattern of bacterial isolates and conception rate in repeat breeders. *Intas Polivet.* 10(1): 32-35.
- Naik, H.S. 1982. Cultural examinations and drug sensitivity test in impregnating repeat breeder Holstein Friesian and Surd buffaloes. *Indian J. Microbiol. Immun. Infec. Dis.* 3: 158-160.
- Robert, S.J., 1986. Infertility in The Cows. In *Veterinary Obstetric and Genital Disease (Theriogenology)*. 3rd ed. Woodstock, Ithaca, New York. pp. 434- 475.
- Sharma, S., Sharma, H., Dhama, A.J., 2008. Physico-microbial properties of cervico-vaginal mucus and its antibiotic sensitivity pattern in repeat breeding buffaloes. *Indian J. Anim. Reprod.* 29(1): 19-26.
- Shukla, S.P., Sharma, R.D., 2005. Bacteriological studies on the uterine biopsy and conception rate following treatment in repeat breeding crossbred cows. *Indian J. Anim. Reprod.* 26(1): 17-19.
- Singh, K.C.P., Pandey J.N., Sinha M.N., Prasad C.B., Prasad C.R., Singh, S.S., 1989. Studies on genital microflora on repeat breeder cows. *Indian Vet. Med. J.* 13(1): 61-63.
- Singh, M., Sharma, M., Pant, H.C., 1998. Microbiological study on cervical mucus of repeat breeder cows in Himachal Pradesh. *Indian Vet. J.* 75(8): 710-712.
- Singh, N.P., Chaturvedi, V.K., Singh, D.P., 1996. Bacteriological studies on repeat breeder bovines. *Indian Vet. J.* 73 (4): 462-463.
- Singia, V.K., Singh, G., Dwivedi, P.N., Sharma, R.D., 1993. In vivo evaluation of drug sensitivity pattern of bacterial isolates in repeat-breeder cows. *Indian J. Anim. Sci.* 63(4): 425-426.
- Sirohi, N.S., Monga, D.P., Knar, S.K., 1989. Microbiological studies on some reproductive disorders of cattle. *Indian J. Anim. Sci.* 59(5): 537-541.
- Subagyo, J., 2016. Kajian Faktor Risiko Repeat Breeding Sebagai Upaya Perbaikan Potensi Reproduksi Sapi Aceh Betina (Studi Kasus di Kabupaten Pidie, Aceh). *Thesis*. Program Studi Kesehatan Masyarakat Veteriner Program Pascasarjana Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh.